

**PHOSPHOGLUKOMUTASE ₁ - SUBTYPISIERUNG
AN MENSCHLICHEN GEWEBEN
ZUR IDENTIFIZIERUNG VON LEICHENTEILEN**

UWE SCHROERS

1985

*Des
München*

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Spann

Phosphoglukomutase₁-Subtypisierung an menschlichen Geweben zur
Identifizierung von Leichenteilen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Uwe Schroers

aus

Mönchengladbach

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Dieter Tröger
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang Spann
Dekan:	Prof. Dr. med. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	27. Juni 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinen Eltern

https://archive.org/details/IA41554815_0072

Inhalt

I.	Einleitung	1
	1. Forensische Bedeutung	1
	2. Chronologische Übersicht	2
	3. Biochemie und Färbetechnik	8
	4. Theorie der isoelektrischen Fokussierung	11
II.	Material und Methodik	15
	1. Untersuchungsgut	15
	2. Gewinnung des Hämolysates	15
	3. Gewinnung der Zellextrakte	16
	4. Isoelektrische Fokussierung	17
	5. Färbung der PGM ₁ -Subtypen	18
III.	Ergebnisse und Diskussion	20
IV.	Zusammenfassung	27
V.	Literatur	29

I. Einleitung

1. Forensische Bedeutung

Die individuelle Ausprägung von menschlichen Geweben spielt in der Rechtsmedizin eine bedeutende Rolle. Von praktischer Bedeutung ist, welche der zur Identifikation einer Person geeigneten Blutgruppenprägungen auch an menschlichen Geweben nachweisbar sind. In diesem Falle könnte man Leichenteile als zusammengehörig erkennen oder sie einer bestimmten Person zuordnen, sofern deren Blutmerkmale bekannt wären. Anwendung fände diese Methode bei Massenkatastrophen, Gewaltverbrechen oder ähnlichem.

Hervorzuheben sei in diesem Zusammenhang der von J. Kömpf und E. Wirth 1972 (18) geschilderte Fall: Eine bis zur Unkenntlichkeit zerstückelte Leiche konnte durch vergleichende Phosphoglukomutase-Isoenzymbestimmungen von Muskulatur und einer Blutprobe identifiziert werden, welche am Tage vorher dem noch lebenden Mann anlässlich eines Trunkheitsdeliktes entnommen worden war.

Die im obigen Fall benutzte Phosphoglukomutase ist auch Gegenstand dieser Arbeit. Sie ist ein Blutgruppenmerkmal, welches seit längerer Zeit seinen festen Platz in der forensisch-medizinischen Serologie, z. B. zur Klärung strittiger Vaterschaftsfragen (2), einnimmt.

2. Chronologische Übersicht

Die Phosphoglukomutase (E. C.: 2. 7. 5. 1.) wurde erstmals 1938 von Cori et al. (9) in verschiedenen Geweben des Kaninchens, in der Muskulatur des Hundes und des Frosches, sowie in Hefeextrakten nachgewiesen. 1948 wurde die PGM von Najjar (28) isoliert und kristallisiert.

In Bezug auf den PGM-Polymorphismus - das gleichzeitige Vorkommen von zwei oder mehr verschiedenen Genotypen in der Bevölkerung - berichtete zuerst Spencer et al. 1964 (34) über erbliche Varianten in menschlichen Geweben, Erythrocyten und Leukozyten. Es gelang ihm mit Hilfe der horizontalen Stärkegelelektrophorese aus sämtlichen untersuchten Hämoly-
saten, Zellkulturen und Gewebsextrakten (Leber, Niere, Gehirn, Haut, Placenta, Herz- und Skelettmuskulatur) mindestens sieben Isoenzyme voneinander zu trennen, die in anodischer Richtung mit a - g bezeichnet wurden.

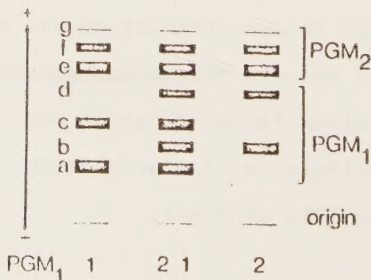


Abb. 1: Das Diagramm verdeutlicht die Lage der von Spencer et al. mittels Stärkegelelektrophorese gefundenen PGM₁-Typen 1, 2-1 und 2

Es zeigte sich, daß bei einem Teil der Probanden die Zonen b und d fehlten, bei einem anderen die Banden a und c. Die Ergebnisse von Familienuntersuchungen ließen die Wirkung zweier alleler Gene PGM 1 und PGM 2 auf einem autosomalen Genort bei kodominantem Erbgang vermuten. Die entsprechenden Phänotypen erhielten die Bezeichnung PGM 1, 2-1 und 2. Die Vermutung, daß ein genetischer Polymorphismus vorläge, wurde durch Untersuchungen an der Placenta gefestigt. Denn bei jedem Kind wurde derjenige Typ gefunden, der auch im Nabelschnurblut angetroffen worden war, welcher jedoch nicht notwendigerweise mit dem mütterlichen Blut übereinstimmte. Demnach mußte der Polymorphismus zumindestens schon vor der Geburt voll ausgebildet sein.

Da die Variabilität auf die Fraktionen a bis d beschränkt war, nahmen HOPKINSON und HARRIS 1965 (13) an, daß die Regionen e bis g von einem anderen Genort gesteuert würden. Sie benannten daher den bisherigen Genort PGM um in PGM_1 , der die Regionen a bis d determiniert. Den Genort, der für die Regionen e bis f zuständig ist, bezeichneten sie als PGM_2 . Der von Ihnen gefundene erste PGM_2 -Phänotyp "Atkinson" bestätigte diese Hypothese.

HOPKINSON und HARRIS vervollständigten 1968 (15) diese Ergebnisse dahingehend, daß sie an Leber, Niere, Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur, Fibroblasten und Plazenta weitere, schneller wandernde Isoenzymbanden beobachtet haben. Diese zeigten einen unabhängig von den oben beschriebenen auto-

somalen Loci PGM_1 und PGM_2 gesteuerten Mustern einen neuen genetischen Polymorphismus, der durch einen dritten PGM -Locus - PGM_3 - determiniert wird. Die PGM_3 -Aktivität ist jedoch in allen Geweben sehr niedrig und auch in Erythrozyten nur mittels einer speziellen Technik auf Stärkegel nachweisbar (6).

In den folgenden Jahren führten weitere Untersuchungen auch an Haarwurzel- und Samenzellen zur Entdeckung von anderen, jedoch sehr seltenen, heterozygoten Varianten im PGM_1 -, PGM_2 - und PGM_3 -System (8, 11, 13, 14, 20, 36, 37).

Mit der Nachweisbarkeit der PGM_1 -Muster an Haut, Muskulatur, Milz und Nieren nach Lagerung beschäftigte sich OEPEN 1973 (31). Sie berichtete, daß die PGM_1 -Typen unter verschiedenen Bedingungen - zweiwöchiger Lagerung bei Zimmertemperatur, fünf Wochen unter fließendem Wasser bei einer Temperatur von 37°C , vier Monate bei -20°C - immer noch diagnostizierbar seien.

Zu Beginn der siebziger Jahre konnten die drei Loci PGM_1 , PGM_2 und PGM_3 den autosomalen Chromosomen 1, 4 und 6 zugeordnet werden (10, 17, 26, 29).

Eine ganz neue Technik in der Darstellung von Enzympolymorphismen wurde dann in den siebziger Jahren entwickelt. ISHIMOTO und KAWATA entdeckten 1972 (16) unter Verwendung der isoelektrischen Fokussierung eine weitaus größere Anzahl von Isoenzymen der menschlichen Erythrocyten- PGM_1 als dies

SPENCER et al. (34) durch Stärkegelelektrophorese gelungen war.

Die grundlegende Arbeit über den Subtypenpolymorphismus im PGM_1 -System wurde jedoch erst 1976 von BARK et al. (1) geliefert. Sie fanden heraus, daß sich die durch SPENCER et al. (34) beobachteten Isoenzymbanden durch isoelektrisches Fokussieren auf Polyacrylamidgel weiter auftrennen lassen. Es wurde nachgewiesen, daß Versuchspersonen, die gemäß der Stärkegelelektrophorese dem PGM_1 1-Phänotyp zuzurechnen waren, beim isoelektrischen Fokussieren einem von drei möglichen Typen, nämlich PGM_1 1+, PGM_1 1- oder PGM_1 1+1- angehören konnten. Gleichermaßen ließ sich der bisherige Phänotyp PGM_1 2 nun in PGM_1 2+, PGM_1 2- oder PGM_1 2+2- aufteilen. Schließlich zeigte auch der unter Stärkegelelektrophorese dargestellte Phänotyp PGM_1 2-1 eine Aufteilung in vier neue Typen, nämlich PGM_1 2+1+, PGM_1 2+1-, PGM_1 2-1+ und PGM_1 2-1-. Diese zehn neuen Phänotypen wurden durch das Vorhandensein von vier gemeinsamen Allelen, nämlich PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} und PGM_1^{2-} am PGM_1 -Locus erklärt. Neun der zehn Phänotypen wurden in von ihnen untersuchten Blutproben nachgewiesen.

Ein ähnliches Ergebnis erzielten unabhängig davon KÜHNLE et al. 1977 (22, 23). Unter Verwendung von Agarosegelelektrophorese, isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamidgel und herkömmlicher Stärkegelelektrophorese wurde festgestellt, daß die Isoenzymbanden von Erythrocyten-Phosphoglukomutase vielfältiger sind als die mittels Stärkegelelektrophorese dargestellten Typen. In einer Untersuchung von 261 Einzelper-

sonen aus Hessen ließ sich ein Großteil dieser zehn Phänotypen wiedergeben. Aus diesen und den Ergebnissen aus weiteren 15 Familien schlossen sie ebenfalls auf die Existenz von vier gemeinschaftlichen Allelen am Genort PGM_1 .

SUTTON und BURGESS kamen 1978 (35) bei einer Untersuchung von 101 Einzelpersonen aus 24 Familien ebenso zum obigen Ergebnis wie WELCH et al. 1978 (40) in einer Untersuchung von 637 Personen aus Gambia.

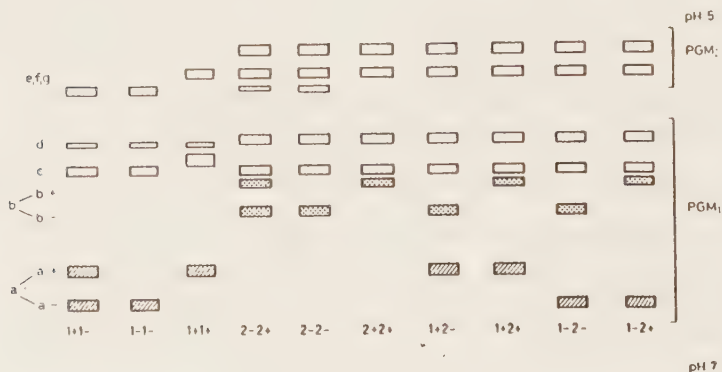


Abb. 2: Das Diagramm zeigt die zehn PGM_1 -Isoenzymbanden von Erythrocytenhämolysaten nach isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamidgel.

Ein wertvolles Ergebnis erzielten auch BERG et al. in den Jahren 1979 (3) und 1981 (4). Sie fokussierten Hämolysate von Alkoholblutproben, die bis zu 500 Tage bei 4°C gelagert worden waren. Dabei ließen sich die PGM_1 -Subtypenmuster bis zu

1 1/2 Jahren in etwa der Hälfte der Fälle noch mehr oder weniger deutlich darstellen.

In allen aufgeführten Arbeiten wurden verschiedene Nomenklaturen für die PGM_1 -Subtypenallele gebraucht. Für die vorliegenden Ausführungen wurde die Nomenklatur gewählt, die von BARK et al. 1976 (1) vorgeschlagen wurde.

Ziel dieser Arbeit ist es nun festzustellen, inwieweit die PGM_1 -Subtypisierung an verschiedenen frischen oder gelagerten, das heißt fäulnisveränderten menschlichen Gewebeproben möglich ist.

3. Biochemie und Färbetechnik

Die Phosphoglukomutase ist in Säugetiergeweben weit verbreitet und spielt im Kohlehydratstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Sie gehört zu den Phosphotransferasen und katalysiert reversibel den Transport der Phosphatgruppe zwischen Glukose-1-Phosphat (Glu-1-P) und Glucose-6-Phosphat (Glu-6-P), also zwischen dem C₁-Atom und dem C₆-Atom des Glukosemoleküls.

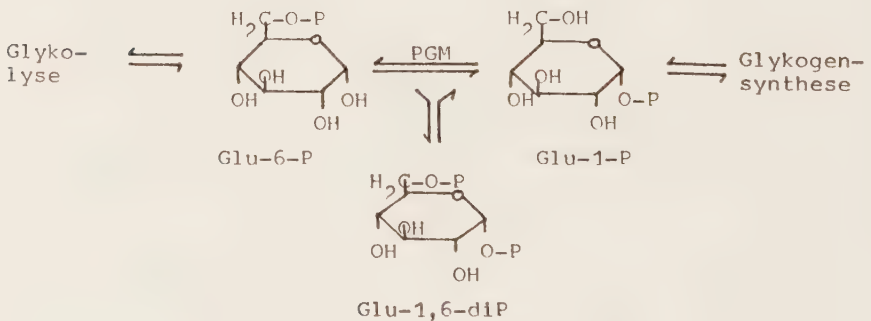


Abb. 3: Das Diagramm zeigt die Position der Phosphoglukomutase im Kohlehydratstoffwechsel

Formal geschieht diese Umwandlung durch intramolekulare Umlagerung. Der Vorgang selbst ist jedoch komplizierter, da die Verschiebung des Phosphorsäureesters über die spezifische Zwischenstufe Glukose-1, 6-DiPhosphat (Glu-1,6-diP) erfolgt. Dieses Molekül hat die Funktion eines Cofaktors, indem es

von einem Molekül Glucose-1, 6-DiPhosphat den Phosphorsäure-rest aus Stellung 1 auf ein Molekül des Substrates Glucose-1-Phosphat in die Position 6 überträgt. Nun übernimmt dieses Molekül die Funktion des Cofaktors, während das zurückbleibende Molekül des Glucose-6-Phosphates zum Endprodukt der Umsetzung wird. Mit der Phosphoglukomutase ist der Anschluß an den Glykolyseweg bzw. den Glykogensyntheseweg hergestellt.

Wie bereits geschildert, stellten SPENCER et al. 1964 (34) fest, daß es sich bei der Phosphoglukomutase um ein Isoenzym-system handelt. Isoenzyme sind Enzyme mit annähernd gleicher katalytischer Aktivität, die sich jedoch durch ihre Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und damit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften her unterscheiden. Bestimmte Organe (Zellen) enthalten in der Regel einen bestimmten Typ des jeweiligen Isoenzym. Ihre nahe Verwandtschaft, jedoch nicht Identität befähigt sie zum Umsatz der gleichen Substrate, jedoch mit gering unterschiedlicher Affinität. In einem gekoppelten enzymatischen Test, bei dem ein farbloses Substrat in ein gefärbtes Reaktionsprodukt umgewandelt wird, können die einzelnen Fraktionen der Phosphoglukomutase-Isoenzyme, nach der Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung, ange-färbt werden. Es muß dabei also ein Reaktionsgemisch gewählt werden, welches in der Lage ist, die Phosphoglukomutase in der Reaktionsfolge zu lokalisieren und sichtbar zu machen. Für diese Arbeit wurde die von KÜHNLE et al. (24) vorgeschlagene Färbemethode benutzt.

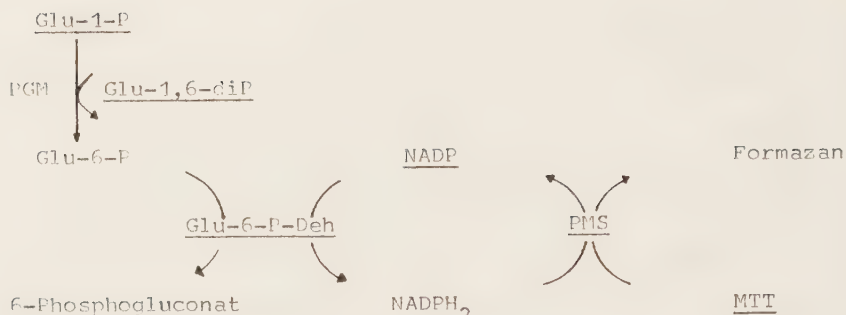


Abb. 4: Das Diagramm zeigt die Reaktionsfolge zur Färbung der PGM-Isoenzymbanden nach der isoelektrischen Fokussierung. Die unterstrichenen Komponenten sind im Reaktionsgemisch enthalten. Die Bedeutung der Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen.

Bei Anwesenheit kleiner Mengen von Glucose-1, 6-DiPhosphat (Glu-1,6-diP) wird die Glucose-1-Phosphat (Glu-1-P) durch die Phosphoglukomutase (PGM) in oben gezeigter Weise zu Glucose-6-Phosphat (Glu-6-P) katalysiert. Durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Glu-6-P-Deh) entsteht gleichzeitig aus der Glucose-6-Phosphat 6-Phosphogluconat und aus NADP NADPH₂. NADPH₂ reduziert, unter Vorhandensein von Phenazinmethosulfat (PMS), welches als Elektronencarrier dient, MTT (Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazoliumbromid) zum blau gefärbten, unlösbaren Formazan, welches sich an der Stelle der PGM-Aktivität ablagert.

Durch Mg-, Mn- und Co-Ionen wird die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes, dessen pH-Optimum zwischen 7,5 und 7,9 liegt, auf das 15fache beschleunigt.

4. Theorie der isoelektrischen Fokussierung

Die Technik der isoelektrischen Fokussierung hat in den letzten Jahren in der Darstellung von Serumproteinen und Isoenzym polymorphismen an Bedeutung gewonnen. Der Grund hierfür liegt in einer wesentlich größeren und genaueren Auflösung gegenüber herkömmlichen Elektrophoresemethoden, so daß diese Methode auch Einzug in Forschungs- und Routinelaboratorien, z. B. bei der Vaterschaftsdiagnostik, gehalten hat.

Peptide, Proteine, Enzyme und z. T. Hormone sind aus unterschiedlichen Aminosäuren aufgebaut. Diese besitzen zwei charakteristische funktionelle Gruppen: die Aminogruppe $-\text{NH}_2$ und die Carbonsäuregruppe $-\text{COOH}$. In wässriger Lösung liegen die

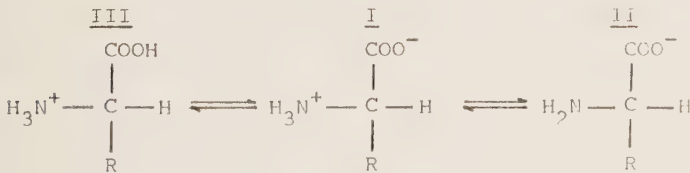


Abb. 5: Zustand von Aminosäuren im sauren (II) und basischen (III) Milieu und an ihrem isoelektrischen Punkt

Aminosäuren meist als Zwitterionen vor, d. h. die Carboxylgruppe kann als saure Gruppe H^+ -Ionen abdissoziieren (- II), die basische Aminogruppe kann H^+ -Ionen aufnehmen (- III). Zur Bildung von Proteinen oder Peptiden werden die Aminosäuren

zu Ketten zusammengefügt, indem jeweils unter Wasserabspaltung eine Carboxylgruppe der einen Aminosäure mit der Aminogruppe der nächsten Aminosäure reagiert. Dabei verschwinden die oben beschriebenen Ladungen. Die 20 verschiedenen Aminosäuren unterscheiden sich nun in dem, in der obigen Abbildung mit "R" gekennzeichneten, Rest, welcher weitere Amino- oder Carboxylgruppen enthalten kann. Ob die Amino- oder Carboxylgruppe H^+ -Ionen aufnimmt oder abgibt, ist abhängig von der Dissoziationskonstanten der Säure- bzw. Aminogruppe und vom pH-Wert der Lösung. Es muß deshalb, abhängig von der Struktur und der chemischen Zusammensetzung der Molekülarten, einen pH-Wert geben, bei dem eine Nettoladung (= Art und Größe der Summenladung, die dieses Molekül als Ganzes nach außen hin zeigt) von Null vorliegt. Man bezeichnet diesen pH-Wert als isoelektrischen Punkt (pI-Wert).

Trägt man eine Proteinlösung bei einem bestimmten pH-Wert auf, so besitzt eine Molekülart eine positive, andere Molekülarten eine negative Nettoladung. Legt man nun ein elektrisches Feld an, so bewegen sich die Proteine zur Elektrode mit der umgekehrten Polarität. Bei herkömmlichen elektrophoretischen Auftrennungen von Proteingemischen verwendet man einen Puffer mit einem konstanten pH-Wert. Die Nettoladungen sind also über den gesamten pH-Wert des Puffers festgelegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Summe der Ladungen ab - diese bestimmt die wirkende elektrische Kraft - und von der Größe und Gestalt der Moleküle, die die Reibungskraft bestimmt. Insbesondere langsam wandernde Zonen, die

kleine Nettoladungen und/oder ein hohes Molekulargewicht besitzen, diffundieren während der Elektrophorese deutlich. Die Folge davon ist eine Bandenverbreiterung und damit eine geringere Nachweisempfindlichkeit.

Bei der isoelektrischen Fokussierung wird nur nach einem stoffspezifischen Kriterium getrennt, nämlich nach unterschiedlichen pI-Werten. Dazu muß innerhalb der Trennstrecke ein linearer und stabiler pH-Gradient vorliegen. Zur Erzeugung solcher pH-Gradienten verwendet man Ampholine^R-Trägerampholyte, die aus einer Vielzahl niedermolekularer Polyamino-polycarbonsäuren bestehen. Diese Trägerampholyte besitzen die verschiedensten pI-Werte im pH-Bereich 2,5 - 11. Durch Fraktionierung bekommt man schmalere pH-Gradienten, wodurch die Auflösung von Proteintrennungen verbessert wird. Für den Anoden- und Kathodenraum wählt man geringe Mengen an Elektrolytlösungen, deren pH-Werte kleiner bzw. größer sind als der gewünschte pH-Bereich des Gradienten. Für diese Arbeit wurden Ampholine^R-Polyacrylamid-gel-Fertigplatten der Firma LKB benutzt, so daß Vergleichsanalysen durchgeführt werden konnten. Trägt man nun die Proteinlösung auf und legt ein elektrisches Feld an, so verlieren die Moleküle bei ihrer Wanderung mehr und mehr an Ladung, bis sie am pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes angekommen sind und dort als schmale Zone fokussieren. Diese Tatsache gab der Methode den Namen "isoelektrische Fokussierung". Die Probenaufgabestelle ist bei der Elektrofokussierung nicht so kritisch

wie bei herkömmlichen Elektrophoresen, da die Diffusion zu jedem Zeitpunkt der Trennung entgegenwirkt und ein Herauswandern oder Herausdiffundieren der Proteine nach Erreichen ihres isoelektrischen Punktes nicht mehr möglich ist.

II. Material und Methodik

1. Untersuchungsgut

Während der Sektionen im Institut für Rechtsmedizin der Universität München wurden von 30 Leichen (23 männliche und 7 weibliche im Sterbealter von 5 Monaten bis 82 Jahren), bei denen keine Fäulnis eingetreten war, Blut und Gewebeteile entnommen. Die Leichen lagerten unter gleichen Bedingungen unterschiedlich lange in den Kühlräumen des Instituts.

2. Gewinnung des Hämolysates

Das entnommene Leichenblut wurde 10 Minuten lang bei 2500 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Sediment wurde nun dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, wobei jedesmal der Überstand abgesaugt und das Sediment weiterbehandelt wurde. Das letzte Sediment wurde dann für die Zeitdauer bis zur jeweiligen isoelektrischen Fokussierung bei -5°C eingefroren. Durch dieses Einfrieren wird die Erythrocytenmembran zerstört, so daß die nachzuweisenden Enzyme austreten können.

Dieses Vorgehen entspricht der in der Vaterschaftsdiagnostik üblichen Methode zur PGM₁-Subtypisierung von Blutproben.

3. Gewinnung der Zellextrakte

Jeder Leiche wurden etwa daumengroße Gewebsstücke von Haut, Leber, Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Niere, Milz, Lunge und Gehirn entnommen. Für die Zerkleinerung und weitere Behandlung der Gewebe wurden dann etwa erbsengroße Stücke benutzt, während der restliche Teil luftdicht abgeschlossen - in für diesen Zweck zurechtgeschnitten und geschweißten Plastiktüten - bei etwa 5 - 10°C gelagert wurde.

Die Homogenisierung erfolgte durch einen Ultra-Turrax-Homogenisator (Junke & Kunkel A.G., Staufen im Breisgau, BRD) und zwar in einer Verdünnung mit Aqua dest. bei Haut 1 : 4, bei Herzmuskulatur, Niere, Milz, Lunge und Gehirn 1 : 9 und bei Leber und Skelettmuskulatur 1 : 19. Dieses Homogenisat wurde dann 12 Stunden lang bei -5°C eingefroren.

Auf diese Weise werden die Zellmembranen auf drei Arten zerstört:

1. durch die Scherkräfte des Homogenisators;
2. durch die Zugabe von Aqua dest. ist die Summe der diffusiblen Ionen innerhalb der Zellen größer als außerhalb, weshalb innen ein höherer Druck entsteht. Diese Drucksteigerung kann von den Zellwänden jedoch nicht toleriert werden, so daß die Zellen platzen;
3. durch das Einfrieren auf -5°C.

Möglich wäre noch die Zerstörung durch Ultraschall, was in dieser Arbeit jedoch nicht ausgenutzt wurde.

Nach 12 Stunden wurde das Homogenisat aufgetaut und über 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation zeigten sich im Reagenzglas drei Abschnitte. Der oberste und unterste Abschnitt bestand aus Zelltrümmern und Blutbestandteilen und wurde verworfen, während der mittlere Abschnitt klar war und die zu untersuchenden Enzyme enthielt. Dieser mittlere Abschnitt wurde entnommen und noch einmal 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Auch diesmal wurde nur der klare Abschnitt des Reagenzglases verwendet und für die anschließende Elektrofokussierung verwertet.

Es zeigte sich, daß die oberste Schicht des Zentrifugates in Masse und Konsistenz von Gewebe zu Gewebe verschieden war, so daß manchmal ein Absaugen dieser Schicht Schwierigkeiten bereitete, was zur Verunreinigung der klaren Schicht führte.

Bei der Bearbeitung des Gehirngewebes fiel auf, daß trotz dreimaliger Zentrifugation größtenteils keine klare Flüssigkeit erzielt werden konnte.

Auch fiel die Homogenisierung der Hautstücke aufgrund der vergleichsweise sehr derben Konsistenz schwer. Trotz längerer und intensiverer Behandlung gegenüber den anderen Gewebsarten konnten bei den Hautproben nie eine vollständige Homogenisierung erreicht werden.

4. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte im Multiphorgerät LKB unter Verwendung von Ampholine^R-Polyacrylamid-Fertiggel-

platten im pH-Bereich von 4 bis 6,5. Die Filterpapierstreifen (Whatman 3, 5x6mm) wurden in die oben beschriebene klare Flüssigkeit eingetaucht und anschließend auf einem größeren Filterpapierstreifen leicht ausgedrückt. Die Platzierung der kleinen Papierstückchen erfolgte 2 cm vom anodalen Ende der Platte entfernt. Die Fokussierungsdauer betrug insgesamt 180 Minuten bei 9°C, mit der Spannung von 1300 Volt, bei 50mA und 30 Watt, wobei die kleineren Filterpapierstücke nach einer Stunde entfernt wurden.

Die weitere technische Ausführung erfolgte gemäß der von KÜHNL in der LKB-Broschüre von 1979 (24) beschriebenen Weise.

5. Färbung der PGM₁-Subtypen

Die Färbung der PGM₁-Subtypen erfolgte ebenfalls in der von KÜHNL (24) angegebenen Weise, die nachstehend mit einigen Abwandlungen speziell für diese Arbeit beschrieben wird.

Zu 10ml "PGM-Stammlösung" (BIOTEST, 18g Trispuffer, 10g MgCl₂ x 6 H₂O, 1g Na-azid mit 1/10 N HCl auf pH 7,9 eingestellt, Aqua dest. ad 1000,00) wurden 40ml Aqua dest. gegeben, womit sich ein Endvolumen von 50ml ergab. In 40ml dieses Puffers wurden 500mg Agarose L (Behringwerke) aufgekocht. Um ein Anbrennen zu verhindern, wurde die Lösung ständig durch einen Magnetrührer bewegt.

Zu den restlichen 10ml des Puffers wurden folgende Sub-

stanzen zugegeben:

Glucose-1-Phosphat	100,00 mg
NADP	10,00 mg
Glucose-1,6-DiPhosphat	0,40 mg
PMS	6,00 mg
MTT	6,00 mg

Diese Substanzen wurden bei Zimmertemperatur durch einen Magnetrührer gelöst. Da diese Lösung lichtempfindlich ist, wurde sie während des Vorganges durch einen Übertopf gegen Helligkeit geschützt.

Nach Abschluß der Fokussierung wurden die 40ml Agarose-lösung auf ca. 50°C abgekühlt. Der Färbelösung von 10ml wurden 20ul Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (aus Hefe) zugegeben und die Flüssigkeit noch einmal kurz gemischt. Dann wurden beide Lösungen vermischt und gleichmäßig auf das waagrecht liegende Gel ausgegossen. Die PGM₁-Isoenzymbanden waren nach 30 - 45 Minuten Inkubation bei 37°C violettblau auf gelbem Hintergrund ablesbar. Bei der Färbung der Hämolytisoenzyme reichte schon eine Inkubationszeit von 10 bis 15 Minuten, so daß diese Banden nach 45 Minuten schon undeutlicher geworden waren.

Von Bedeutung war es, daß stets bekannte Isoenzymtypen von Hämolyсатаn mitliefen, um eventuelle Varianten ausschließen zu können.

Der oben beschriebene Vorgang wurde bei jeder Darstellung angewendet, sowohl bei der sofortigen, als auch bei der einwöchigen und zweiwöchigen Untersuchung.

III. Ergebnisse und Diskussion

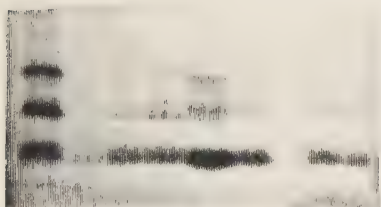
Die in dieser Arbeit auf PGM₁-Subtypen untersuchten Leichen stimmten mit der von BARK et al. 1976 (1) aufgestellten Hypothese überein, wonach der PGM₁-Subtypenpolymorphismus durch vier verschiedene Allele gesteuert wird. Es wurden jedoch nur 6 der 10 Subtypen im Laufe dieser Arbeit gefunden, deren Auftreten sich wie folgt verhält:

PGM ₁ 1+1+	8x	PGM ₁ 1+1-	9x
PGM ₁ 1+2+	9x	PGM ₁ 1+2-	2x
PGM ₁ 2+2-	1x	PGM ₁ 2+2+	1x

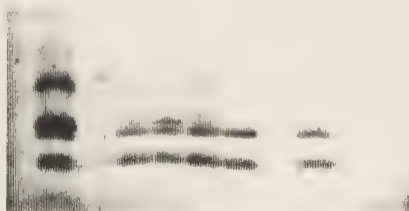
Die restlichen PGM₁-Subtypen, nämlich PGM₁ 1-1-, PGM₁ 1-2+, PGM₁ 1-2- und PGM₁ 2-2- wurden nicht gefunden. Die nachfolgenden Resultate gelten jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für diese Phänotypen.

Die Untersuchungen von Leichen, die bis zu drei Tagen alt waren und im folgenden Text mit "frisch" bezeichnet werden, zeigte, daß grundsätzlich an allen untersuchten Geweben bzw. Organen eine PGM₁-Subtypisierung möglich ist. In Einzelfällen stellten sich die Isoenzymbanden bei der Verwendung von Lunge und Milz nur schwach dar; gehäuft konnten diese Abschwächungen jedoch bei Proben von Gehirn und Haut festgestellt werden. Die deutlichste Darstellung gelang bei Verwendung von Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur. Diese Beobachtung bestätigt die 1972 von OEPEN (31) gemachte Aussage, daß sich Haut nur sehr schwer zur Darstellung bringen läßt, während sich die

Skelettmuskulatur dafür hervorragend eignet. Diese Tatsache ist offensichtlich auf den unterschiedlichen Gehalt an Phosphoglukomutase in den verschiedenen Organen bzw. Geweben zurückzuführen. Eine weitere Ursache für die schlechte Darstellung von Gehirn und Haut ist vielleicht in den methodischen Schwierigkeiten zu sehen, welche oben beschrieben wurden.



1 2 3 4 5 6 7 8 9
Abb. 6



1 2 3 4 5 6 7 8 9
Abb. 7

Abb. 6 + 7: Darstellung der PGM_1 -Phänotypen 1+1+ (Abb. 6) und 1+2+ (Abb. 7) an frischem Material.

1 = Hämolysat, 2 = Haut, 3 = Leber, 4 = Skelettmuskulatur, 5 = Herzmuskulatur, 6 = Niere, 7 = Milz, 8 = Lunge, 9 = Gehirn

Nach einer Lagerungszeit von einer Woche nach der ersten Untersuchung, d. h. etwa 7 bis 10 Tage nach Eintritt des Todes, gelang bei Verwendung von Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur noch in allen dreißig Fällen die richtige Diagnostizierung der Subtypen. An den übrigen Geweben bzw.

Organen waren deutlich erkennbare Banden größtenteils nicht mehr vorhanden. In Einzelfällen fanden sich nach einer Woche Lagerung Aufspaltungen und Konversionsprodukte einzelner Banden, wie sie durch BERG et al. 1981 (4) an Blutproben beobachtet worden waren. Es kam hierbei zu Aufspaltungen einer Zone in zwei Fraktionen mit benachbarten isoelektrischen Punkten, so daß z. B. beim Ausgangstyp PGM_1 1+1+ der Typ PGM_1 1+2+ vorgetäuscht wurde. Diese Tatsache verfälschte das Ergebnis jedoch nicht, da durch das gleichzeitige Mitführen von bereits subtypisierten Referenzblutproben ein Erkennen und Ausschließen dieser Artefakte möglich war.

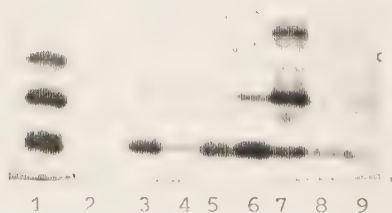


Abb. 8

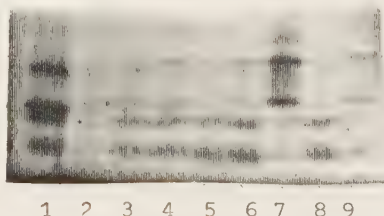


Abb. 9

Abb. 8 + 9: Darstellung der PGM_1 -Phänotypen 1+1+ (Abb. 8) und 1+2+ (Abb. 9) an einer Woche gelagertem Material. Anordnung wie in Abbildung 6 und 7.

Nach einer Lagerungszeit von zwei Wochen, d. h. ca. 14 bis 17 Tage nach Eintritt des Todes, konnte an keinem der untersuchten Gewebe eine Subtypisierung noch zufrieden-

stellend durchgeführt werden. Auch bei den Organen, bei denen noch nach einer Woche eine ausreichende Diagnostizierung gelungen war, konnte man jetzt meist überhaupt keine Aktivität der Isoenzyme nachweisen. Die mitgeführten Referenzblutproben waren jedoch nur gering abgeschwächt und zeigten eine noch sichere Diagnostizierbarkeit. Diese im Vergleich zu den Gewebeproben nur geringe Veränderung ist auf die Lagerung der Hämolysate bei -5°C zurückzuführen, was eine längere Haltbarkeit gewährleistet (4).

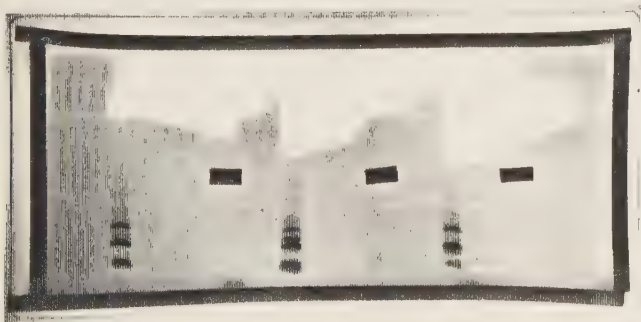


Abb. 10

Abb. 10: Darstellung der nicht mehr sichtbaren Phänotypen (von links nach rechts) PGM_1 1+1+, 1+1- und 1+2+ der in Abbildung 6 und 7 aufgeführten Organe bei noch sichtbaren Referenzblutproben der gleichen Phänotypen.

Wie bereits erwähnt, wurden die Lagerungsversuche bei Zimmertemperatur durchgeführt. Schon nach einer Woche zeigte

sich, daß die Organstücke eine bereits deutliche Konsistenzveränderung im Sinne der Fäulnis aufwiesen und nach zwei Wochen weitgehend zerfließlich waren. In besonderer Weise trifft dies auf die Proben des Gehirngewebes zu, welche schon nach einer Woche in einem hohen Maße autolysiert waren.

Aus dieser Untersuchung geht hervor, daß bis zu einer Zeit von etwa 8 bis 10 Tagen nach Todeseintritt eine korrekte Diagnostizierung der PGM₁-Subtypen gestellt werden kann. Dies trifft in besonderem Maße für die Organteile von Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur zu, während sich Haut und Gehirn weniger eignen. Schon OEPEN berichtete 1972 (30) in Untersuchungen mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese, daß sich die quergestreifte Skelettmuskulatur am besten aufbereiten ließe und die besten Befunde ergäbe. Diese Tatsache ist auch sehr günstig, da bei Unfällen, Massenkatastrophen oder Ähnlichem Skelettmuskulatur fast immer zur Verfügung steht und auch gegenüber Autolyseprozessen nicht sehr anfällig ist. Demgegenüber kann die Aussage, daß Haut, Milz und Niere gleichsinnig reagieren für die jetzige Untersuchung mittels isoelektrischer Fokussierung nicht bestätigt werden, da bei Haut nur schwache kaum sichtbare Banden auch an frischen Gewebsstücken nachweisbar waren. Auch Milz und Niere stimmten in ihrer Isoenzymaktivität nicht in allen Fällen überein.

Auch die Diagnostizierbarkeitsdauer der PGM_1 an den von Ihr untersuchten Organen, die Sie mit zwei Wochen bei Zimmertemperatur angibt, kann nicht bestätigt werden, da sich die PGM_1 -Subtypen nach zwei Wochen Lagerung fast durchweg nicht mehr darstellen ließen.

Die Verringerung der PGM_1 -Isoenzymaktivität, die zwischen der ersten und zweiten Woche anscheinend ihren Höhepunkt besitzt und die als Artefakte zu wertenden Aufspaltungsbanden können durch mehrere Faktoren erklärt werden. Molekülveränderungen durch bakterielle Einflüsse spielen dabei, wie BERG et al. (4) berichteten, eine genau so wichtige Rolle wie chemische Reaktionen in der Art von Oxidation, Methylierung, Deamidierung und Denaturierung. Diese Reaktionen sind in der sterbenden Zelle, in der die Atmung ausgesetzt hat, immer zu beobachten. Da die Glykolyse jedoch noch eine Zeit lang anhält, kommt es zu einer Senkung des pH-Wertes. Die synthetisierenden Enzyme werden blockiert, während die lytischen Enzyme, die im sauren pH-Bereich ihr pH-Optimum besitzen, aktiviert werden. Diese Enzymgruppen zerstören innerhalb kurzer Zeit die Struktur und damit die Eigenschaften der PGM_1 . Folglich ist auch eine Nachweisbarkeit nicht mehr möglich.

Es ist aus Fäulnisuntersuchungen bekannt, daß an der menschlichen Leiche in toto oder an großen Leichenteilen die Fäulnis weniger rasch fortschreitet als an den hier verwendeten kleinen Organstücken. Es kann somit davon ausgegangen werden,

daß auch an Leichenteilen bzw. ganzen Leichen mit einer Lagerungszeit von mehr als einer Woche im konkreten Fall noch eine ausreichende PGM₁-Subtypisierung möglich ist.

IV. Zusammenfassung

Es wurden von 30 leichen Gewebsstücke entnommen, und zwar von Haut, Leber, Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur, Niere, Milz, Lunge und Gehirn. Diese Organteile wurden in frischem Zustand, d. h. 1 bis 3 Tage nach Eintritt des Todes, nach einer Lagerungszeit von einer und von zwei Wochen mittels isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamidgel auf die PGM₁-Subtypen hin untersucht.

Es kann festgestellt werden, daß prinzipiell an allen frisch untersuchten Geweben die PGM₁-Subtypisierung möglich ist. Nur in einigen Fällen bei Lunge und Gehirn, gehäuft jedoch bei Haut und Gehirn waren nur schwache bzw. kaum sichtbare Banden nachzuweisen, was auf einen geringen Gehalt an Isoenzymaktivität in diesen Organen zurückzuführen ist. Bei Verwendung von Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur wurden die deutlichsten Banden sichtbar.

Nach einer Lagerungszeit von einer Woche gelang nur noch an Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur in allen dreißig Fällen die richtige Typisierung, während an den übrigen Organen nur noch verschwommene oder teilweise keine deutlich erkennbaren Banden mehr vorhanden waren.

Nach einer Lagerungszeit von zwei Wochen war an keinem der Organ- bzw. Gewebeteile eine Typisierung möglich, da sich in aller Regel keine Banden mehr abbildeten. Zusätzlich konnte man auch deutliche Zeichen der Fäulnis an allen untersuchten Proben erkennen.

Man kann aufgrund dieser Untersuchungen davon ausgehen, daß sich Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur zur PGM₁-Subtypisierung gut eignen und bei diesen eine sichere Diagnostizierung auch nach einer Lagerungszeit von einer Woche noch möglich ist. Da bekannt ist, daß die Fäulnis an ganzen Leichen bzw. an großen Leichenteilen weniger schnell fortschreitet als bei den in dieser Arbeit verwendeten kleinen Stücken, kann davon ausgegangen werden, daß im konkreten Fall an Leichen bzw. Leichenteilen auch mit einer Lagerungszeit von mehr als einer Woche trotzdem noch eine richtige PGM₁-Subtypisierung möglich ist.

V. Literatur

1. Bark, J. E., Harris, M. J., Firth, M.: Typing of the common phosphoglucumutase variants using isoelectric focusing - a new interpretation of the phosphoglucumutase system. J. Forens. Sci. Soc. 16, 115-120 (1976)
2. Berg, K., Schwarzfischer, F., Wischerath, H.: Zur Verwendung des Systems PGM im Gutachten. Ärztl. Lab. 3/1975 87-97
3. Berg, S., Ladiges, O., Ladiges, M. - L.: Über die Nachweisbarkeit der Tf^C - und PGM_1 -Subtypen in gealterten Blutproben. Arch. Kriminol. 164, 101-106, (1979)
4. Berg, S., Ladiges, O., Ladiges, M. - L.: Der Einfluß von Blutproben- und Spurenalterung auf das PGM_1 - und Gc-Subtypenmuster, Z. Rechtsmedizin 87, 85-94 (1981)
5. Berndt, H., Kox, N.: Untersuchungen über lagerungsbedingte Veränderungen von Isoenzymmustern (PGM, AK, ADA) mit Hilfe der CAF-Elektrophorese, Ärztl. Lab. 3/1975 87-97
6. Bissbort, S., Ritter, H., Kömpf, J.: PGM_1 -subtyping by means of starch gel electrophoresis, Hum. Genet. 45, 175-177 (1978)
7. Brinkmann, B., Koops, E., Klopp, O., Heindl, K.: Inherited parital deficiency of the PGM_1 gene: biochemical and densitometric studies, Ann. Hum. Genet. (London) 35, 363-366 (1972)

8. Burgess, R. M., Sutton, J. G., M. Sc, Whitehead, P. H.:
An improved means of enzyme typing of hair roots using
isoelectric focusing. J. of Forens. Sci. 24, 392-396
(1979)
9. Cori, G. T., Colowick, S. P., Cori, C. F.: J. Biol. Chem.
123, 375 (1938)
10. Douglas, G. R., McAlpine, P. J., Hamerton, J. L.: Regional
localisation of loci for human PGM₁ and 6-PGD on human
chromosome one by use of hybrids of chinese hamster-
human somatic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70
2737 (1973)
11. Fisher, R. A., Putt, W., Harris, H.: Secondary isozymes
derived from three PGM loci, Ann. Hum. Genet. (London)
36, 69-77 (1972)
12. Fisher, R. A., Putt, W., Harris, H.: The distribution of
isoelectric points of human soluble proteins and in
particular of the enzyme products of 88 human gene loci.
Ann. Hum. Genet. (London) 40, 371-384 (1977)
13. Hopkinson, D. A., Harris, H.: Evidence for a second struc-
tural locus determining human phosphoglucomutase.
Nature (London) 208, 410 (1965)
14. Hopkinson, D. A., Harris, H.: Rare phosphoglucomutase pheno-
types. Ann. Hum. Genet. (London), 30, 167-178 (1966)

15. Hopkinson, D. A., Harris, H.: A third phosphoglucomutase locus in man. *Ann. Hum. Genet.* (London), 31, 359-367 (1968)
16. Ishimoto, G., Kawata, M.: Red cell enzyme typing by gel electrofocusing. Reports of the national research institute of police science (Japan), Vol. 25, No. 4, 1972 13-16
17. Jongsma, A., VanSomeren, H., Westerfeld, A., Hagemeyer, A., Pearson, P.: Localisation of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. Assignment of PGM_3 to chromosomes C6 and regional mapping of the PGD, PGM_1 and Pep-C genes on chromosome A1. *Humangenetik* 20, 195 (1973)
18. Kömpf, J., Wirth, E.: Identifizierung einer unbekannten Leiche durch vergleichende Isoenzymbestimmungen aus Blut und Muskulatur. *Archiv für Kriminologie* 150, 49-50 (1972)
19. Kühnl, P., Schmidtman, U., Spielmann, W.: Evidence for two additional common alleles at the PGM_1 locus. *Hum. Genet.* 35, 219-223 (1977)
20. Kühnl, P., Schmidtman, U., Spielmann, W.: Hinweis für zwei weitere häufige Allele am PGM_1 -Locus. *Ärztl. Lab.* 23, 229-232 (1977)
21. Kühnl, P., Langake, U., Spielmann, W., Neubauer, M.: Investigations on the polymorphism of sperm diaphorase in man. *Hum. Genet.* 40, 79-86 (1977)

22. Kühnl, P., Spielmann, W.: Investigations on the PGM_1^a polymorphism by isoelectric focusing. Hum. Genet. 43, 57-67 (1978)
23. Kühnl, P., Schmidtman, U., Spielmann, W.: Untersuchungen zum Polymorphismus der Phosphoglukomutase mittels isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAGIF). 7. int. Tagung der Ges. für forensische Blutgruppenkunde, Hamburg, 243-252
24. Kühnl, P.: Elektrofokussierung in der forensischen Serologie. LKB-Broschüre, Bromma 1979, 5-28
25. Kühnl, P.: Elektrofokussierung in der forensischen Serologie. Ärztl. Lab. 25, 39-43 (1979)
26. McAlpine, P. J., Mohandas, T., Hamerton, J. L.: Isozyme analysis of somatic cell hybrids: Assignment of the PGM_2 gene locus to chromosome 4 in man with data on the molecular structure and human chromosome assignments of six additional markers. In: Isozymes, IV, p. 149 Genetics and evolution. New York: Academic press 1975
27. Mueller, B.: Gerichtliche Medizin, Springer Verlag, 2. Aufl. 1978, 1225-1228 und 1253-1256
28. Najjar, V. A.: J. Biol. Chem. 175, 281 (1948)
29. Nguyen, V. C., Billardon, C., Picard, J. Y., Feingold, J., Frézal, J.: Liaison probable (linkage) entre le locus PGM_1 et peptidase C chez l'homme. C. R. Acad. Sci. (D) Paris 272, 485 (1971)

30. Oepen, I.: Zur Blutgruppenprägung menschlicher Gewebe.
Habilitationsschrift Marburg 1972
31. Oepen, I.: AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmung an Haut,
Muskulatur, Milz und Niere zur Identifizierung von Leichen-
teilen. Beitr. gerichtl. Med. 31, 300-306 (1973)
32. Oepen, I.: Fortschritte der Hämatologie, Band IV: Blut-
gruppen, 4. Zur Blutgruppenprägung menschlicher Körper-
gewebe, Johann Ambrosius, Barth Leipzig 334-340 (1977)
33. Parrington, J. M., Cruickshank, G., Hopkinson, D. A.,
Robson, E. B., Harris, H.: Linkage relationships between
the three phosphoglucomutase loci PGM_1 , PGM_2 and PGM_3 .
Ann. Hum. Genet. (London) 32, 27-35 (1968)
34. Spencer, N., Hopkinson, D. A., Harris, H.: Phosphogluco-
mutase polymorphism in man, Nature 204, 742-745 (1964)
35. Sutton, J. G., Burgess, R.: Genetic evidence for four
common alleles at the phosphoglucomutase-1 locus (PGM_1)
detectable by isoelectric focusing. Vox Sang. 34,
97-103 (1978)
36. Sutton, J. G.: Isoelectric focusing: A single technique for
examining PGM-isozymes in blood, semen, saliva and hair.
8. int. Tag. für forens. Blutgruppenserologie, London
261-266

37. Sutton, J. G.: Further alleles of phosphoglucomutase in human semen detected by isoelectric focusing, J. Forens. Sci. 24, 189-192 (1979)
38. Sutton, J. G.: Charakterisation of the isoenzymes of phosphoglucomutase (PGM) determined by the first (PGM₁) and second (PGM₂) locus observed by isoelectric focusing, Hum. Genet. 47, 279-290 (1979)
39. Svensson, M., Wetterling, G.: Experience with isoelectric focusing in PGM₁-subtyping. 8. int. Tag. der Ges. für forens. Blutgruppenserologie, London 557-561
40. Welch, S. G., Swindlehurst, C. A., McGregor, I. A., Williams, K.: Isoelectric focusing of human red cell phosphoglucomutase. Hum. Genet. 43, 307-313 (1978)

L e b e n s l a u f

Name: Uwe Schroers

Geburtsdatum: 06. 09. 1958

Geburtsort: Schwalmtal

Eltern: Dr. med. Herbert Schroers,
Facharzt für Allgemeinmedizin
Margot Schroers, geb. Sachs,
Hausfrau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bekenntnis: römisch-katholisch

Schulbildung: 1965 - 1968 Volksschule in Mönchen-
gladbach 6
1968 - 1977 Stiftisch Humanistisches
Gymnasium in Mönchen-
gladbach 6
Abitur: 18. 06. 1977

Wehrdienst: 1977 - 1978

Studium: 1978 - 1985 Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Uni-
versität in München.
Ärztliche Staats-
prüfung: 10. 04. 1985
07. 05. 1985
Approbation:
20. 05. 1985

